

## **FORMULACIONES LÍQUIDAS DE FOSFAPLATINO**

### **REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS**

Esta solicitud reivindica el beneficio de acuerdo con 35 U.S.C. § 119 (e) de la solicitud provisional estadounidense N.º 62/319.047, presentada el 6 de abril de 2016, que se incorpora a la presente por referencia en su totalidad.

### **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas de compuestos de fosfaplatino útiles como agentes anticancerosos, en particular formulaciones líquidas estables listas para usar en el tratamiento de diversos tipos de cáncer.

### **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Los complejos de fosfaplatino monoméricos han demostrado un gran potencial para el tratamiento de una variedad de enfermedades, incluso una amplia gama de tipos de cáncer. Ver, por ejemplo, WO 2009/021082, WO 2011/153365, y WO 2012/096722. Al igual que muchos compuestos de platino terapéuticamente útiles, los complejos de fosfaplatino se administran generalmente por vía parenteral, por ejemplo, inyecciones intravenosas ("i.v." o "iv"). Los fármacos para administración parenteral se formulan típicamente como líquidos, o como sólidos liofilizados que requieren la reconstitución con un vehículo estéril antes de la administración. Las formulaciones líquidas son altamente preferibles a las formulaciones liofilizadas porque a) son más económicas y más fáciles de fabricar, y b) son mucho más fáciles de administrar ya que no requieren reconstitución con un vehículo estéril antes de su uso. El pH de las formulaciones líquidas de fármaco para la administración iv se formulan típicamente en un rango de pH cercano al rango fisiológico del pH de la sangre (7,3-7,4) para evitar los

desafíos clínicos asociados con la administración de una formulación de fármaco cuyo pH difiere significativamente del de la sangre. Las formulaciones líquidas que son estables y se almacenan fácilmente a temperatura ambiente son altamente preferibles a las formulaciones líquidas o liofilizadas, que deben almacenarse en condiciones de refrigeración o congelación. Debido a la posible degradación de los complejos de fosfaplatino monoméricos en soluciones acuosas, especialmente en condiciones ácidas, sigue siendo un desafío la preparación de formulaciones líquidas estables listas para usar de estos compuestos.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención, en un aspecto, proporciona composiciones farmacéuticas líquidas que comprenden un compuesto de fosfaplatino y una solución amortiguadora acuosa que tiene un pH de 7 o superior, con un rango de pH preferido que va de 7-9. La solución amortiguadora es una solución acuosa que comprende una sal de fosfato, una sal de carbonato/bicarbonato, o una combinación de estas.

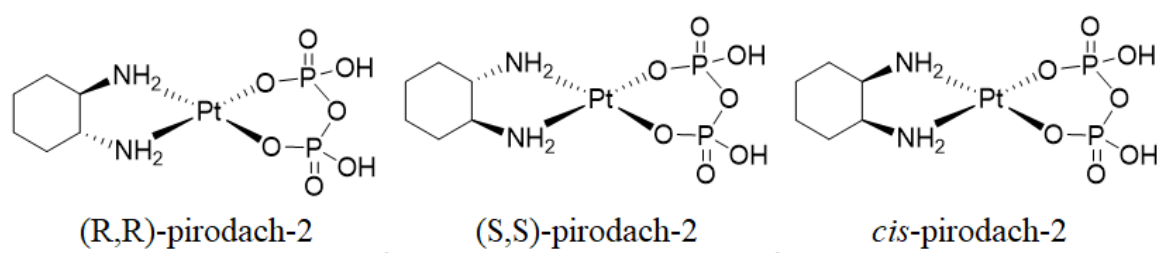
En algunas formas de realización, el compuesto de fosfaplatino es un complejo pirofosfato-platino (II) que tiene una fórmula de (I) o (II):



o una sal de aquel, en donde  $R^1$  y  $R^2$  se seleccionan, cada uno, independientemente de  $NH_3$ , de aminas alifáticas sustituidas o no sustituidas y de aminas aromáticas sustituidas o no sustituidas; y en donde  $R^3$  se selecciona de 1,2-diaminas alifáticas o aromáticas sustituidas o no sustituidas.

En algunas formas de realización con mayor preferencia, el compuesto de fosfaplatino se selecciona del grupo que consiste en

trans-1,2-ciclohexanodiamina-(dihidrogenopirofosfato)platino (II) ("trans-piroadach-2"), cualquiera de los dos enantiómeros (R,R)-piroadach-2 y (S,S)-piroadach-2, y cis-1,2-ciclohexanodiamina-(dihidrogenopirofosfato)platino (II) ("cis-piroadach-2").



Las formas de realización con mayor preferencia de las formulaciones demuestran el potencial de estabilidad de múltiples años a temperatura ambiente. Las formulaciones proporcionan una solución concentrada estéril de (R,R)-piroadach-2 que se diluye fácilmente en líquidos i.v. estándar utilizados en la administración i.v. de fármacos contra el cáncer o una solución estéril en una concentración adecuada en un vial listo para usar en un paciente.

En otro aspecto, la presente invención proporciona procesos para elaborar formulaciones líquidas, en particular formulaciones listas para usar, de compuestos de fosfaplatino en una solución amortiguadora como se describe en la presente, el proceso comprende las etapas de: a) disolver un compuesto de fosfaplatino en un amortiguador acuoso que comprende una cantidad suficiente de base de hidróxido de manera que el pH permanece en 7 o por encima; b) opcionalmente, agregar una base de hidróxido para ajustar el pH a un rango deseado, y c) filtrar la solución para obtener una formulación líquida.

En otro aspecto, la presente invención está dirigida al uso de una formulación líquida estable de acuerdo con cualquier forma de realización descrita en la presente en el tratamiento de un tipo de cáncer.

Estos y otros aspectos de la presente invención serán apreciados mejor por referencia al siguiente dibujo, descripción detallada y reivindicaciones.

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La Figura 1 ilustra la potencia de las soluciones tapadas de 1 mg/ml de (R,R)-pirodach-2 en diversos amortiguadores almacenados en cámaras de estabilidad controladas a 25 °C/60 % de RH, según lo monitoreado por HPLC.

La Figura 2 ilustra la potencia de las soluciones tapadas de 1 mg/ml de (R,R)-pirodach-2 en varios amortiguadores almacenados en cámaras de estabilidad controladas a 40 °C/75 % de RH, según lo monitoreado por HPLC.

La Figura 3 ilustra la potencia de soluciones tapadas de 1 mg/ml de (R,R)-pirodach-2 en un amortiguador de fosfato de potasio de 10 mM a razón de diversos pH almacenadas en cámaras de estabilidad controladas a 25 °C/60 % de RH según lo monitoreado por HPLC.

La Figura 4 ilustra la potencia de las soluciones tapadas de 1 mg/ml de (R,R)-pirodach-2 en un amortiguador de fosfato de potasio de 10 mM a razón de diversos pH almacenadas en cámaras de estabilidad controladas a 40 °C/75 % de RH según lo monitoreado por HPLC.

#### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN**

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fosfaplatino y una solución amortiguadora acuosa que tiene un pH igual o superior a 7.

En una forma de realización de acuerdo con este aspecto, a veces preferido, la composición farmacéutica es una formulación líquida lista para usar adecuada para la administración parenteral.

En algunas formas de realización de acuerdo con este aspecto,

la concentración del compuesto de fosfaplatino es de alrededor de 20 mg/ml o menos.

En algunas formas de realización de acuerdo con este aspecto, la concentración del compuesto de fosfaplatino es de entre alrededor de 1 y alrededor de 10 mg/ml.

En algunas formas de realización de acuerdo con este aspecto, la concentración del compuesto de fosfaplatino es de entre alrededor de 1 y alrededor de 6 mg/ml.

En otra forma de realización de acuerdo con este aspecto, la concentración del compuesto de fosfaplatino es de alrededor de 5 mg/ml.

En otra forma de realización de acuerdo con este aspecto, el amortiguador comprende una sal de fosfato o bicarbonato/carbonato.

En algunas formas de realización, el amortiguador comprende iones de la familia fosfato, es decir, fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), hidrógeno fosfato ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ), y/o dihidrogenofosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ).

En algunas formas de realización, el amortiguador comprende iones de la familia carbonato, es decir, bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) y carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ).

En algunas formas de realización, el amortiguador comprende tanto iones de la familia fosfato (iones  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ , y/o  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) como iones de la familia carbonato (es decir,  $\text{HCO}_3^-$  and  $\text{CO}_3^{2-}$ ).

En algunas formas de realización de acuerdo con este aspecto, la concentración de sal amortiguadora es de entre alrededor de 1 mM y alrededor de 100 mM.

En algunas formas de realización de acuerdo con este aspecto, la concentración de sal amortiguadora es de entre alrededor de 5 mM y alrededor de 50 mM.

En algunas formas de realización de acuerdo con este aspecto, la concentración de sal amortiguadora es de alrededor de 10 mM.

En algunas formas de realización de acuerdo con este aspecto,

el pH de la composición farmacéutica líquida está en el rango que va de alrededor de 7,0 a alrededor de 9,0.

En algunas formas de realización de acuerdo con este aspecto, el pH de la composición farmacéutica líquida está en el rango que va de alrededor de 7,0 a alrededor de 8,0.

En algunas formas de realización de acuerdo con este aspecto, el amortiguador contiene sales de fosfato de sodio o potasio, o una combinación de estos.

En algunas formas de realización de acuerdo con este aspecto, el amortiguador contiene fosfato de potasio; la concentración del compuesto de fosfaplatino es de 5 mg/ml y el pH está en el rango que va de alrededor de 7,0 a alrededor de 8,0.

En algunas formas de realización de acuerdo con este aspecto, la concentración de amortiguador es de alrededor de 10 mM.

En algunas formas de realización de acuerdo con este aspecto, el amortiguador comprende una sal de pirofosfato.

En algunas formas de realización de acuerdo con este aspecto, la relación molar de anión pirofosfato con respecto al compuesto de fosfaplatino va de al menos 0,1 a 1.

En algunas formas de realización de acuerdo con este aspecto, la relación molar de ion pirofosfato con respecto al compuesto de fosfaplatino va de alrededor de 0,2 a 1

En algunas formas de realización de acuerdo con este aspecto, la relación molar de ion pirofosfato con respecto al compuesto de fosfaplatino va de alrededor de 0,4 a 1.

En algunas formas de realización de acuerdo con este aspecto, la concentración del compuesto de fosfaplatino es de alrededor de 5 mg/ml, la concentración de pirofosfato es de alrededor de 5,2 mM, y el pH está en el rango que va de alrededor de 7,0 a alrededor de 8,0.

En algunas formas de realización de acuerdo con este aspecto,

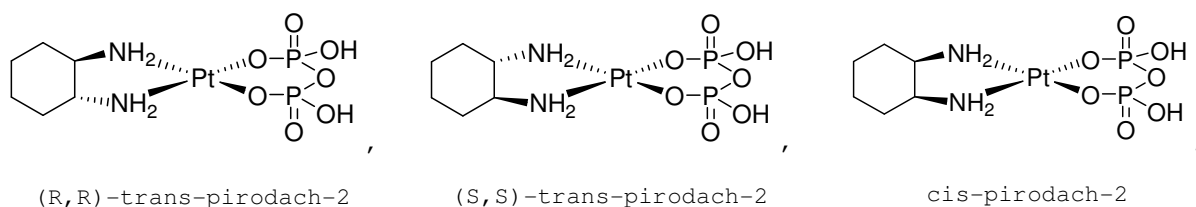
el compuesto de fosfaplatino es un complejo pirofosfato-platino (II) que tiene una fórmula de (I) o (II):



o una sal de aquel, en donde  $R^1$  y  $R^2$  se seleccionan, cada uno, independientemente de  $NH_3$ , de aminas alifáticas sustituidas o no sustituidas y de aminas aromáticas sustituidas o no sustituidas; y en donde  $R^3$  se selecciona de 1,2-diaminas alifáticas o aromáticas sustituidas o no sustituidas.

En algunas formas de realización preferidas,  $R^1$  y  $R^2$  en la fórmula (I) se seleccionan cada uno independientemente de  $NH_3$ , metilamina, etilamina, propilamina, isopropilamina, butilamina, ciclohexanoamina, anilina, piridina y piridina sustituida; y  $R^3$  en la fórmula (II) se selecciona de etilendiamina y ciclohexanodiamina.

En algunas formas de realización con mayor preferencia de acuerdo con este aspecto, el compuesto de fosfaplatino es un complejo de 1,2-ciclohexanodiamina-(dihidrogenopirofosfato)platino(II) ("pirodach-2") seleccionado del grupo que consiste en:



En una forma de realización preferida de acuerdo con este aspecto, el compuesto de fosfaplatino es un complejo trans-1,2-ciclohexanodiamina-(dihidrogenopirofosfato)platino(II) ("trans-piroadach-2").

En otra forma de realización preferida de acuerdo con este aspecto, el compuesto de fosfaplatino es (R,R)-trans-1,2-

ciclohexanodiamina-(dihidrogenopirofosfato)platino (II) (" (R,R) - trans-pirodach-2").

En otra forma de realización preferida de acuerdo con este aspecto, el compuesto de fosfaplatino es (S,S)-trans-1,2-ciclohexanodiamina-(dihidrogenopirofosfato)platino(II) (" (S,S)- trans-pirodach-2").

En otra forma de realización preferida de acuerdo con este aspecto, el compuesto de fosfaplatino es cis-1,2-ciclohexanodiamina-(dihidrogenopirofosfato)-platino(II) ("cis-pirodach-2").

En algunas formas de realización, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas líquidas de fosfaplatino de acuerdo con cualesquiera combinaciones razonables de las formas de realización descritas en la presente.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica líquida de acuerdo con cualquier forma de realización descrita en la presente, o cualquier combinación de estas, para usar en el tratamiento de una enfermedad o trastorno.

En algunas formas de realización, la enfermedad o trastorno es un tipo de cáncer.

En algunas formas de realización, el cáncer incluye, entre otros, aquellos seleccionados de cáncer ginecológico, cáncer genitourinario, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer gastrointestinal, cáncer de mama, de hueso y cartílago, y cáncer hematológico.

En algunas formas de realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de testículo, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de estómago, cáncer de hueso, cáncer de glioblastoma y cáncer de colon.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de una composición farmacéutica líquida de acuerdo con cualquier forma de realización descrita en la presente, o cualquier combinación de estas, para usar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno. La enfermedad o trastorno incluye un tipo de cáncer, lo que incluye, entre otros, cualquiera de cáncer ginecológico, cáncer genitourinario, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer gastrointestinal, cáncer de mama, hueso y cartílago, y cáncer hematológico. Ejemplos no limitativos más específicos incluyen cáncer de ovario, cáncer de testículo, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de estómago, cáncer de hueso, cáncer de glioblastoma y cáncer de colon.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un proceso de preparación de una composición farmacéutica líquida de compuesto de fosfaplatino de acuerdo con cualquiera de las formas de realización descritas en la presente, o cualquier combinación de estas, el proceso comprende: a) disolver un compuesto de fosfaplatino en un amortiguador acuoso que comprende una cantidad suficiente de base de hidróxido de manera que el pH permanezca en 7 o por encima; b) opcionalmente, agregar una base de hidróxido para ajustar el pH a un rango deseado, y c) filtrar la solución para obtener una formulación líquida.

En una forma de realización de acuerdo con este aspecto, el amortiguador acuoso es un amortiguador de fosfato, un amortiguador de carbonato/bicarbonato, o una combinación de estos.

En otra forma de realización de acuerdo con este aspecto, el pH de la formulación líquida está en el rango que va de alrededor de 7,0 a alrededor de 9,0.

En otra forma de realización de acuerdo con este aspecto, el procedimiento incluye además la adición de una cantidad suficiente de una sal de pirofosfato para estabilizar el compuesto de fosfaplatino en la formulación líquida.

En otra forma de realización de acuerdo con este aspecto, dicho filtrado se lleva a cabo en condiciones estériles.

En otra forma de realización de acuerdo con este aspecto, el procedimiento comprende además la etapa d) introducir la solución en un vial, taponar y tapar el vial en un ambiente estéril de manera que la formulación esté lista para usar.

En otra forma de realización de acuerdo con este aspecto, la formulación líquida obtenida es una formulación de acuerdo con cualquiera de las formas de realización descritas en la presente, o cualquier combinación de estas.

Cuando el término "alrededor de" se aplica a un parámetro, tal como el pH, la concentración, o similares, indica que el parámetro puede variar un  $\pm 10$  %, preferentemente dentro de un  $\pm 5$  %, y con mayor preferencia dentro de un  $\pm 5$  %. Como entendería una persona del oficio de nivel medio, cuando un parámetro no es crítico, a menudo se da un número solo con fines ilustrativos, en lugar de ser limitante.

Los términos "un/una" o "el/la", como se usan en la presente, representan formas tanto en singular como en plural. En general, cuando se usa una forma singular o plural de un sustantivo, denota formas tanto singulares como plurales del sustantivo.

La presente invención es igualmente aplicable a todos los estereoisómeros de los complejos de pirodac-2, como entendería una persona del oficio de nivel medio, aunque la siguiente descripción detallada utiliza solo el isómero (R,R)-pirodach-2 (o "PT-112") como un ejemplo no limitativo para ilustrar ciertos aspectos de la presente invención.

(R,R)-pirodach-2 es un diácido, que muestra una baja solubilidad en agua. Los valores pKa de los dos grupos ácidos en (R,R)-pirodach-2 son aproximadamente 2,6 y 4,4 (*Inorg. Chem.* **47**, 7942 (2008)). Por lo tanto, la simple disolución de (R,R)-pirodach-2 produce una solución ácida. En condiciones acuosas ácidas, (R,R)-pirodach-2 sufre rápidamente una degradación hidrolítica. A pH más altos, donde los grupos ácidos de (R,R)-pirodach-2 están ionizados, aumenta la solubilidad de (R,R)-pirodach-2. Además, la desprotonación de los grupos ácidos en (R,R)-pirodach-2 reduce dramáticamente la velocidad de degradación hidrolítica. Los dos valores pKa de (R,R)-pirodach-2 indican que una solución acuosa de (R,R)-pirodach-2 en el rango de pH fisiológico que va de 7,0-7,5 no tendrá capacidad de amortiguación. Por lo tanto, es extremadamente difícil controlar el pH de una solución acuosa en el rango de pH fisiológico, y mucho menos la preparación precisa y reproducible de soluciones acuosas de (R,R)-pirodach-2 en este rango de pH mediante el ajuste de pH de una solución acuosa de (R,R)-pirodach-2 con base de hidróxido. Por lo tanto, el desarrollo de formulaciones acuosas de (R,R)-pirodach-2 con estabilidad de pH controlada en el rango de pH fisiológico que va de 7 - 7,5 requiere preferentemente el uso de un amortiguador. Esto presenta un desafío único ya que el ligando pirofosfato en (R,R)-pirodach-2 es cinéticamente lábil en solución y puede potencialmente reaccionar con los aniones presentes en muchos amortiguadores. La Tabla 1 resume la disminución en la potencia medida por HPLC de soluciones acuosas de 1 mg/ml de (R,R)-pirodach-2 en una variedad de amortiguadores a temperatura ambiente. El sistema de HPLC y las condiciones utilizadas para monitorear la estabilidad se resumen en la Tabla 2.

Tabla 1

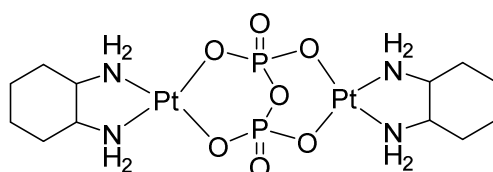
| Amortiguador                     | Conc. de amortiguador (mM) | pH   | Disminución de la potencia |        |         |         |
|----------------------------------|----------------------------|------|----------------------------|--------|---------|---------|
|                                  |                            |      | 4 días                     | 7 días | 11 días | 14 días |
| Acetato                          | 20 mM                      | 5,32 | –                          | 13,5 % | –       | –       |
| Ácido cítrico                    | 20 mM                      | 6,51 | 1,9 %                      | –      | 3,9 %   | –       |
| Trietanolamina                   | 20 mM                      | 7,97 | 1,9 %                      | –      | 5,7 %   | –       |
| L-arginina                       | 20 mM                      | 7,72 | 4,0 %                      | –      | 10 %    | –       |
| NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> | 100 mM                     | 7,94 | –                          | –      | –       | 47,1%   |
| NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> | 50 mM                      | 7,83 | –                          | –      | –       | 18,0 %  |
| NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> | 20 mM                      | 7,68 |                            |        |         | 8,0 %   |

Tabla 2

|                           |                                                                                                                        |
|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Columna                   | Waters Symmetry C18, 4,6 x 250 mm, tamaño de partícula de 5 µm                                                         |
| Temperatura de la columna | Ambiente                                                                                                               |
| Velocidad de flujo        | 1 mg/ml                                                                                                                |
| Volumen de inyección      | 25 µl                                                                                                                  |
| Fase móvil                | 15 % de acetonitrilo / 5 mM de hidrogenosulfato de tetrabutilamonio al 85% + 10 mM de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> |
| Detección                 | UV                                                                                                                     |

Para desarrollar una formulación acuosa lista para usar y estable de (R,R)-pirodach-2 con un pH controlado en el rango que va de 7,0–8,0, la selección de amortiguadores por su falta de reactividad con respecto a (R,R)-pirodach-2 en una solución acuosa dio como resultado la identificación de amortiguadores de fosfato y bicarbonato/carbonato como de máxima preferencia. Se observó que la temperatura impactaba en la estabilidad, con una estabilidad más pobre observada a temperaturas más altas. Se descubrió que la concentración de amortiguador también impactaba en la estabilidad de la solución (R,R)-pirodach-2, con una estabilidad más pobre observada a concentraciones de amortiguador más altas; mientras que el impacto del catión asociado con el amortiguador (por ejemplo, potasio en relación a sodio, etc.) fue mínimo, si es que lo hubo. En un sistema amortiguador de bicarbonato/carbonato, se encontró que el pH tenía un impacto significativo en la estabilidad de (R,R)-pirodach-2, observándose una estabilidad disminuida a un pH más alto, donde aumenta la relación de concertación de ion carbonato con respecto a ion bicarbonato. Por el contrario, en los amortiguadores de fosfato, se encontró que el pH tenía un impacto

mínimo sobre la estabilidad de (R,R)-pirodach-2 cuando el pH estaba por encima de 7. Por debajo de pH 7, se observó que la degradación daba como resultado la formación de una especie dimérica (dímero de (R,R)-pirodach-2), que es altamente insoluble y se precipita de la solución. Dado el potencial para la degradación en presencia de ion carbonato en un sistema amortiguador de bicarbonato/carbonato y por la pérdida potencial de capacidad de amortiguación debido al equilibrio con CO<sub>2</sub> en la atmósfera o espacio entre la tapa y el producto de un recipiente, el fosfato ofrece un sistema de amortiguación superior para la fabricación de una formulación acuosa amortiguada lista para usar (R,R)-pirodach-2 con el pH controlado en el rango fisiológico que va de 7 a 7,5, particularmente en un entorno de fabricación a gran escala.



"Dímero de pirodach-2"

La congelación de una formulación acuosa es una forma de retardar la velocidad de degradación y mejorar la estabilidad de una sustancia farmacológica formulada en medios acuosos. Se evaluó el impacto de un ciclo de congelación y descongelación sobre la estabilidad de (R,R)-pirodach-2 en una variedad de amortiguadores. Los datos resumidos en la Tabla 3 muestran un mayor nivel de degradación con mayores concentraciones de amortiguador. Además, se observa un mayor nivel de degradación con la sal de sodio en comparación con la sal de potasio en los sistemas amortiguadores de fosfato en consistencia con la observación de la precipitación selectiva de fosfato de disodio durante la congelación, lo que resulta en una disminución significativa del pH durante la congelación, un fenómeno no observado en un amortiguador de fosfato de potasio (Archives of Biochemistry and Biophysics **384**, 398,

2000). Por lo tanto, el uso de sales de potasio es preferible al uso de sales de sodio en formulaciones amortiguadas de (R,R)-pirodach-2 de fosfato.

Tabla 3

| Solución de 1 mg/ml de (R,R)-pirodach-2 en | pH de la solución | Cambio en la pureza después del ciclo de congelación y descongelación |
|--------------------------------------------|-------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| 10 mM de fosfato de Na                     | 7,02              | 99,5 %                                                                |
| 100 mM de fosfato de Na                    | 6,98              | 96,3 %                                                                |
| 10 mM de fosfato de K                      | 7,01              | 99,7 %                                                                |
| 100 mM de fosfato de K                     | 7,02              | 99,1 %                                                                |
| 10 mM de carbonato de Na                   | 10,84             | 99,1 %                                                                |
| 100 mM de carbonato de Na                  | 11,39             | 93,7 %                                                                |
| 10 mM de bicarbonato de Na                 | 8,18              | 99,5 %                                                                |
| 100 mM de bicarbonato de Na                | 8,06              | 98,8 %                                                                |

La solubilidad de (R,R)-pirodach-2 en solución acuosa amortiguada a un pH de 7 - 7,5 indica que se pueden lograr fácilmente soluciones de al menos 20 mg/ml. Sin embargo, el uso clínico de agentes oncolíticos de platino como (R,R)-pirodach-2 indica que una concentración de 5 mg/ml es altamente deseable para una formulación acuosa lista para usar. El modelado de la capacidad de amortiguación muestra que una concentración de 10 mM de fosfato o bicarbonato proporciona suficiente capacidad de amortiguación y un aceptable control de pH para una solución acuosa de 5 mg/ml de (R,R)-pirodach-2.

La rápida degradación hidrolítica de (R,R)-pirodach-2, en particular la formación de la impureza dimérica altamente insoluble tanto en la disolución de (R,R)-pirodach-2 en agua como en un medio amortiguador como el amortiguador de fosfato cuando el pH está por debajo del neutro, impide la fabricación a gran escala de una formulación acuosa lista para usar de (R,R)-pirodach-2, ajustada al rango de pH fisiológico de 7-7,5 al simplemente agregar base a una suspensión de (R,R)-pirodach-2 en agua o al agregar una solución amortiguadora para efectuar la disolución, seguido de un ajuste al rango de pH deseado. Más bien, el control efectivo de la degradación y la formación de impurezas requiere la disolución de

la (R,R)-pirodach-2 en condiciones de pH casi neutro o básico. Hemos encontrado que esto se puede lograr al agregar (R,R)-pirodach-2 a una solución de amortiguador y al agregar suficiente base de hidróxido para neutralizar todo el (R,R)-pirodach-2 agregado. Una vez que se han disuelto todos los sólidos, el pH de la solución se ajusta al rango final deseado mediante la adición de una pequeña cantidad de hidróxido. De esta manera, la disolución de la sustancia farmacológica se lleva a cabo en condiciones de pH casi neutro o básicas.

Un proceso escalable y comercialmente viable para la fabricación de una formulación lista para usar de (R,R)-pirodach-2 en un amortiguador de 10 mM ajustado a un pH de 7,0 - 7,5 comprende los pasos de: a) preparar una solución acuosa de 10 mM de amortiguador; b) agregar suficiente base de hidróxido para efectuar la neutralización de la (R,R)-pirodach-2 agregada para alcanzar un pH de alrededor de 7; c) agregar (R,R)-pirodach-2 y dejar que se disuelva; d) si es necesario, agregar hidróxido adicional para ajustar el pH a un rango de alrededor de 7,0 - 7,5; y e) filtrar la solución en condiciones estériles, llenar la solución en viales de vidrio y cubrirla con un tapón y/o una tapa. Se generaron datos de estabilidad en dos lotes grandes de 5 mg/ml de (R,R)-pirodach-2 en 10 mM de amortiguador de fosfato de potasio. Se evaluó uno de estos lotes a pH=7,2 en condiciones de 25 °C/60 % de RH y de refrigeración (2-8 °C), y los datos se resumen en la Tabla 4 y la Tabla 5, respectivamente. Si bien se observa una degradación lenta durante 24 meses a 25 °C/60 % de RH, en condiciones de refrigeración, la formulación muestra una excelente estabilidad durante el mismo período o uno aún más prolongado (36 meses) (ver Tabla 5). Se han realizado observaciones similares para la formulación líquida lista para usar a un pH de 7,4, como se ilustra en la Tabla 6 y la Tabla 7.

Tabla 4

Estabilidad de la formulación acuosa lista para usar de (R,R)-pirodach-2 a 25 °C/60 % de RH (5 mg/ml de (R,R)-pirodach-2 en 10 mM de amortiguador de fosfato de potasio a un pH de 7,2) en viales de 10 ml

| Parámetro                                                 | Inicial                                       | 1 mes                                         | 2 meses                                       | 3 meses                                       | 4 meses                                       | 6 meses                                       |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Apariencia                                                | Solución clara, incolora, libre de partículas | Solución clara, incolora, libre de partículas | Solución clara, incolora, libre de partículas | Solución clara, incolora, libre de partículas | Solución clara, incolora, libre de partículas | Solución clara, incolora, libre de partículas |
| Ensayo (Potencia)                                         | 99,8 %                                        | 96,5 %                                        | 99,5 %                                        | 98,2 %                                        | 97,9 %                                        | 97,5 %                                        |
| Total de sustancias relacionadas                          | 2 %                                           | 2 %                                           | 2 %                                           | 2 %                                           | 2 %                                           | 3 %                                           |
| (DACH) Pt-diacuo (~RRT 0,3)                               | 0,16 %                                        | 0,15 %                                        | 0,09 %                                        | 0,19 %                                        | 0,13 %                                        | 0,15 %                                        |
| (DACH) Pt-monoacuo (~RRT 0,7)                             | 0,98 %                                        | 0,75 %                                        | 0,96 %                                        | 0,73 %                                        | 1,05 %                                        | 1,03 %                                        |
| (DACH) Pt-dicloruro (RRT 1,3-1,6)                         | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            |
| RRT 3,1-3,2                                               | ND                                            | 0,22 %                                        | 0,32 %                                        | 0,37 %                                        | 0,38 %                                        | 0,40 %                                        |
| Dímero de PT-112 (~ RRT 4,0)                              | 0,19 %                                        | 0,33 %                                        | 0,36 %                                        | 0,37 %                                        | 0,36 %                                        | 0,37 %                                        |
| RRT 0,41                                                  | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            |
| RRT 0,46                                                  | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            |
| RRT 0,50                                                  | ND                                            | ND                                            | 0,05 %                                        | 0,08 %                                        | 0,09 %                                        | 0,15 %                                        |
| RRT 0,58                                                  | 0,13 %                                        | 0,13 %                                        | 0,15 %                                        | 0,18 %                                        | 0,20 %                                        | 0,21 %                                        |
| RRT 0,67                                                  | 0,05 %                                        | 0,06 %                                        | 0,09 %                                        | 0,06 %                                        | 0,07 %                                        | 0,07 %                                        |
| RRT 0,86                                                  | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            | 0,05 %                                        |
| RRT 3,46                                                  | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            | 0,05 %                                        | ND                                            |
| RRT 3,65                                                  | ND                                            | ND                                            | 0,08 %                                        | 0,11 %                                        | 0,13 %                                        | 0,24 %                                        |
| RRT 4,97                                                  | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            | 0,05 %                                        |
| pH                                                        | 7,2                                           | 7,2                                           | 7,2                                           | 7,3                                           | 7,1                                           | 7,2                                           |
| Esterilidad                                               | Estéril                                       | NT                                            | NT                                            | NT                                            | NT                                            | Estéril                                       |
| Material particulado (Oscurecimiento ligero) <sup>1</sup> | 219 partículas por contenedor                 | NT                                            | NT                                            | NT                                            | NT                                            | 20 partículas por contenedor                  |
|                                                           | 11 partículas por contenedor                  | NT                                            | NT                                            | NT                                            | NT                                            | 3 partículas por contenedor                   |
| Endotoxina bacteriana (Turbidimétrico cinético)           | < 0,35 EU/ml                                  | NT                                            | NT                                            | NT                                            | NT                                            | < 0,35 EU/ml                                  |

Tabla 4 (cont.)

| Parámetro                                       | Inicial                                       | 9 meses                                       | 12 meses                                      | 15 meses                                      | 18 meses                                      | 24 meses                                      |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Apariencia                                      | Solución clara, incolora, libre de partículas | Solución clara, incolora, libre de partículas | Solución clara, incolora, libre de partículas | Solución clara, incolora, libre de partículas | Solución clara, incolora, libre de partículas | Solución clara, incolora, libre de partículas |
| Ensayo (Potencia)                               | 99,8 %                                        | 96,8 %                                        | 96,8 %                                        | 98,1 %                                        | 99,0 %                                        | 97,5 %                                        |
| Total de sustancias relacionadas                | 2 %                                           | 3 %                                           | 3 %                                           | 3 %                                           | 4 %                                           | 5 %                                           |
| (DACH) Pt-diacuo (~RRT 0,3)                     | 0,16 %                                        | 0,16 %                                        | 0,18 %                                        | 0,14 %                                        | 0,14 %                                        | 0,15 %                                        |
| (DACH) Pt-monoacuo (~RRT 0,7)                   | 0,98 %                                        | 1,10 %                                        | 0,91 %                                        | 0,84 %                                        | 1,04 %                                        | 0,83 %                                        |
| (DACH) Pt-dicloruro (RRT 1,3-1,6)               | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            |
| RRT 3,1-3,2                                     | ND                                            | 0,30 %                                        | 0,44 %                                        | 0,41 %                                        | 0,40 %                                        | 0,41 %                                        |
| Dímero de PT-112 (~ RRT 4,0)                    | 0,19 %                                        | 0,39 %                                        | 0,33 %                                        | 0,29 %                                        | 0,30 %                                        | 0,36 %                                        |
| RRT 0,41                                        | ND                                            | ND                                            | 0,05 %                                        | 0,07 %                                        | 0,06 %                                        | 0,12 %                                        |
| RRT 0,46                                        | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            | 0,10 %                                        |
| RRT 0,50                                        | ND                                            | 0,19 %                                        | 0,26 %                                        | 0,37 %                                        | 0,36 %                                        | 0,70 %                                        |
| RRT 0,58                                        | 0,13 %                                        | 0,27 %                                        | 0,26 %                                        | 0,26 %                                        | 0,29 %                                        | 0,17 %                                        |
| RRT 0,67                                        | 0,05 %                                        | 0,10 %                                        | 0,13 %                                        | 0,07 %                                        | 0,11 %                                        | 0,07 %                                        |
| RRT 0,86                                        | ND                                            | 0,05 %                                        | 0,05 %                                        | ND                                            | 0,14 %                                        | ND                                            |
| RRT 3,46                                        | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            | 0,07 %                                        |
| RRT 3,65                                        | ND                                            | 0,39 %                                        | 0,52 %                                        | 0,63 %                                        | 0,75 %                                        | 1,24 %                                        |
| RRT 4,97                                        | ND                                            | 0,08 %                                        | 0,20 %                                        | 0,28 %                                        | 0,43 %                                        | 0,73 %                                        |
| pH                                              | 7,2                                           | 7,2                                           | 7,2                                           | 7,3                                           | 7,2                                           | 7,2                                           |
| Esterilidad                                     | Estéril                                       | NT                                            | Estéril                                       | NT                                            | NT                                            | Estéril                                       |
| Material particulado (Oscurecimiento ligero)    | 219 partículas por contenedor                 | NT                                            | 36 partículas por contenedor                  | NT                                            | NT                                            | 81 partículas por contenedor                  |
|                                                 | 11 partículas por contenedor                  | NT                                            | 2 partículas por contenedor                   | NT                                            | NT                                            | 4 partículas por contenedor                   |
| Endotoxina bacteriana (Turbidimétrico cinético) | < 0,35 EU/ml                                  | NT                                            | < 0,35 EU/ml                                  | NT                                            | NT                                            | < 0,35 EU/ml                                  |

ND = No detectado; NT = No probado

Tabla 5

Estabilidad de la formulación acuosa lista para usar de (R,R)-pirodach-2 a 2-8 °C (5 mg/ml de (R,R)-pirodach-2 en 10 mM de amortiguador de fosfato de potasio a un pH de 7,2) en viales de 10 ml

| Parámetro                                         | Inicial                                        | 1 mes                                          | 2 meses                                        | 3 meses                                        | 4 meses                                        | 6 meses                                        | 9 meses                                        |
|---------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Apariencia                                        | Solución clara, incolora, libre de partículas. | Solución clara, incolora, libre de partículas. | Solución clara, incolora, libre de partículas. | Solución clara, incolora, libre de partículas. | Solución clara, incolora, libre de partículas. | Solución clara, incolora, libre de partículas. | Solución clara, incolora, libre de partículas. |
| Ensayo (Potencia)                                 | 99,8 %                                         | 97,7 %                                         | 100,1 %                                        | 98,2 %                                         | 98,6 %                                         | 98,4 %                                         | 97,8 %                                         |
| Total de sustancias relacionadas                  | 2 %                                            | 1 %                                            | 1 %                                            | 2 %                                            | 2 %                                            | 2 %                                            | 2 %                                            |
| (DACH) Pt-diacuo (~RRT 0,3)                       | 0,16 %                                         | 0,17 %                                         | 0,09 %                                         | 0,18 %                                         | 0,13 %                                         | 0,18 %                                         | 0,14 %                                         |
| (DACH) Pt-monoacuo (~RRT 0,7)                     | 0,98 %                                         | 0,84 %                                         | 0,91 %                                         | 0,82 %                                         | 0,88 %                                         | 0,91 %                                         | 1,05 %                                         |
| (DACH) Pt-dicloruro (RRT 1,3-1,6)                 | ND                                             | ND                                             | ND                                             | ND                                             | ND                                             | ND                                             | ND                                             |
| RRT 3,1-3,2                                       | ND                                             | ND                                             | ND                                             | 0,08 %                                         | 0,07 %                                         | 0,10 %                                         | 0,10 %                                         |
| Dímero de PT-112 (~RRT 4,0)                       | 0,19 %                                         | 0,21 %                                         | 0,25 %                                         | 0,31 %                                         | 0,27 %                                         | 0,28 %                                         | 0,29 %                                         |
| RRT 0,46                                          | ND                                             | ND                                             | ND                                             | ND                                             | ND                                             | ND                                             | ND                                             |
| RRT 0,50                                          | ND                                             | ND                                             | ND                                             | ND                                             | 0,05 %                                         | ND                                             | ND                                             |
| RRT 0,56                                          | 0,13 %                                         | 0,11 %                                         | 0,10 %                                         | 0,12 %                                         | 0,13 %                                         | 0,12 %                                         | 0,16 %                                         |
| RRT 0,68                                          | 0,05 %                                         | ND                                             | 0,06 %                                         | 0,05 %                                         | ND                                             | 0,05 %                                         | 0,06 %                                         |
| RRT 3,54                                          | ND                                             | ND                                             | ND                                             | ND                                             | ND                                             | ND                                             | ND                                             |
| pH                                                | 7,2                                            | 7,2                                            | 7,2                                            | 7,2                                            | 7,3                                            | 7,3                                            | 7,2                                            |
| Esterilidad                                       | Estéril                                        | NT                                             | NT                                             | NT                                             | NT                                             | Estéril                                        | NT                                             |
| Material particulado (Oscurecimiento Ligero)      | 219 partículas por contenedor                  | NT                                             | NT                                             | NT                                             | NT                                             | 150 partículas por contenedor                  | NT                                             |
|                                                   | 11 partículas por contenedor                   | NT                                             | NT                                             | NT                                             | NT                                             | 8 partículas por contenedor                    | NT                                             |
| Endotoxina Bacteriana T (Turbidimétrico Cinético) | < 0,35 EU/ml                                   | NT                                             | NT                                             | NT                                             | NT                                             | < 0,35 EU/ml                                   | NT                                             |

Tabla 5 (cont.)

| Parámetro                                         | Inicial                                        | 12 meses                                       | 15 meses                                       | 18 meses                                       | 24 meses                                       | 30 meses                                       | 36 meses                                       |
|---------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Apariencia                                        | Solución clara, incolora, libre de partículas. | Solución clara, incolora, libre de partículas. | Solución clara, incolora, libre de partículas. | Solución clara, incolora, libre de partículas. | Solución clara, incolora, libre de partículas. | Solución clara, incolora, libre de partículas. | Solución clara, incolora, libre de partículas. |
| Ensayo (Potencia)                                 | 99,8 %                                         | 97,8 %                                         | 98,7 %                                         | 100,3 %                                        | 97,1 %                                         | 98,2 %                                         | 97,8 %                                         |
| Total de sustancias relacionadas                  | 2 %                                            | 2 %                                            | 2 %                                            | 2 %                                            | 2 %                                            | 2 %                                            | 3 %                                            |
| (DACH) Pt-diacuo (~RRT 0,3)                       | 0,16 %                                         | 0,20 %                                         | 0,15 %                                         | 0,15 %                                         | 0,17 %                                         | 0,14 %                                         | 0,12 %                                         |
| (DACH) Pt-monoacuo (~RRT 0,7)                     | 0,98 %                                         | 1,02 %                                         | 0,92 %                                         | 0,93 %                                         | 0,82 %                                         | 0,96 %                                         | 1,16 %                                         |
| (DACH) Pt-dicloruro (RRT 1,3-1,6)                 | ND                                             | ND                                             | ND                                             | ND                                             | ND                                             | ND                                             | ND                                             |
| RRT 3,1-3,2                                       | ND                                             | 0,16 %                                         | 0,22 %                                         | 0,19 %                                         | 0,22 %                                         | 0,31 %                                         | 0,30 %                                         |
| Dímero de PT-112 (~RRT 4,0)                       | 0,19 %                                         | 0,29 %                                         | 0,29 %                                         | 0,31 %                                         | 0,31 %                                         | 0,33 %                                         | 0,36 %                                         |
| RRT 0,46                                          | ND                                             | ND                                             | ND                                             | ND                                             | 0,06 %                                         | ND                                             | 0,07 %                                         |
| RRT 0,50                                          | ND                                             | 0,06 %                                         | 0,07 %                                         | 0,07 %                                         | 0,22 %                                         | 0,17 %                                         | 0,23 %                                         |
| RRT 0,56                                          | 0,13 %                                         | 0,16 %                                         | 0,19 %                                         | 0,19 %                                         | 0,09 %                                         | 0,19 %                                         | 0,11 %                                         |
| RRT 0,68                                          | 0,05 %                                         | 0,10 %                                         | 0,06 %                                         | 0,07 %                                         | 0,05 %                                         | 0,08 %                                         | 0,09 %                                         |
| RRT 3,54                                          | ND                                             | ND                                             | ND                                             | 0,05 %                                         | 0,11 %                                         | 0,10 %                                         | 0,14 %                                         |
| pH                                                | 7,2                                            | 7,2                                            | 7,2                                            | 7,3                                            | 7,2                                            | 7,2                                            | 7,2                                            |
| Esterilidad                                       | Estéril                                        | Estéril                                        | NT                                             | NT                                             | Estéril                                        | Estéril                                        | NT                                             |
| Material particulado (Oscurecimiento Ligero)      | 219 partículas por contenedor                  | 236 partículas por contenedor                  | NT                                             | NT                                             | 41 partículas por contenedor                   | 62 partículas por contenedor                   | NT                                             |
|                                                   | 11 partículas por contenedor                   | 4 partículas por contenedor                    | NT                                             | NT                                             | 12 partículas por contenedor                   | 6 partículas por contenedor                    | NT                                             |
| Endotoxina Bacteriana T (Turbidimétrico Cinético) | < 0,35 EU/ml                                   | < 0,35 EU/ml                                   | NT                                             | NT                                             | < 0,35 EU/ml                                   | < 0,35 EU/ml                                   | NT                                             |

ND = No detectado; NT = No probado

Tabla 6

Estabilidad de la formulación acuosa lista para usar de (R,R)-pirodach-2 a 25 °C/60 % de RH (5 mg/ml de (R,R)-pirodach-2 en 10 mM de amortiguador de fosfato de potasio a un pH de 7,4) en viales de 10 ml

| Parámetro                                                 | Inicial                                       | 1 mes                                         | 3 meses                                       | 6 meses                                       | 9 meses                                       | 12 meses                                      |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Apariencia                                                | Solución clara, incolora, libre de partículas | Solución clara, incolora, libre de partículas | Solución clara, incolora, libre de partículas | Solución clara, incolora, libre de partículas | Solución clara, incolora, libre de partículas | Solución clara, incolora, libre de partículas |
| Ensayo (Potencia)                                         | 98,1 %                                        | 98,4 %                                        | 99,2 %                                        | 96,7 %                                        | 98,2 %                                        | 98,0 %                                        |
| Total de sustancias relacionadas                          | 2 %                                           | 3 %                                           | 3 %                                           | 3 %                                           | 4 %                                           | 4 %                                           |
| (DACH) Pt-diacuo (~RRT 0,3)                               | 0,16 %                                        | 0,16 %                                        | 0,15 %                                        | 0,19 %                                        | 0,14 %                                        | 0,11 %                                        |
| (DACH) Pt-monoacuo (~RRT 0,7)                             | 0,84 %                                        | 1,12 %                                        | 0,92 %                                        | 0,30 %                                        | 0,79 %                                        | 0,92 %                                        |
| (DACH) Pt-dicloruro (RRT 1,3-1,6)                         | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            |
| RRT 3,1-3,2                                               | 0,11 %                                        | 0,56 %                                        | 0,77 %                                        | 0,86 %                                        | 0,84 %                                        | 0,82 %                                        |
| Dímero de PT-112 (~ RRT 4,0)                              | 0,34 %                                        | 0,35 %                                        | 0,33 %                                        | 0,36 %                                        | 0,34 %                                        | 0,30 %                                        |
| RRT 0,42                                                  | ND                                            | ND                                            | ND                                            | 0,06 %                                        | 0,08 %                                        | 0,10 %                                        |
| RRT 0,46                                                  | ND                                            | ND                                            | ND                                            | 0,09 %                                        | 0,08 %                                        | 0,07 %                                        |
| RRT 0,50                                                  | 0,06 %                                        | 0,07 %                                        | 0,11 %                                        | 0,31 %                                        | 0,39 %                                        | 0,38 %                                        |
| RRT 0,56                                                  | 0,08 %                                        | 0,15 %                                        | 0,20 %                                        | 0,09 %                                        | 0,11 %                                        | 0,19 %                                        |
| RRT 0,68                                                  | 0,09 %                                        | 0,21 %                                        | 0,11 %                                        | 0,16 %                                        | 0,11 %                                        | 0,11 %                                        |
| RRT 0,86                                                  | ND                                            | 0,06 %                                        | 0,05 %                                        | 0,07 %                                        | 0,06 %                                        | 0,05 %                                        |
| RRT 3,29                                                  | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            |
| RRT 3,41                                                  | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            | 0,08 %                                        | ND                                            |
| RRT 3,44                                                  | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            | ND                                            |
| RRT 3,58                                                  | ND                                            | ND                                            | 0,14 %                                        | 0,37 %                                        | 0,65 %                                        | 0,70 %                                        |
| RRT 4,95                                                  | ND                                            | ND                                            | ND                                            | 0,06 %                                        | 0,21 %                                        | 0,34 %                                        |
| pH                                                        | 7,4                                           | 7,4                                           | 7,4                                           | 7,4                                           | 7,4                                           | 7,5                                           |
| Esterilidad                                               | Estéril                                       | NT                                            | NT                                            | Estéril                                       | NT                                            | Estéril                                       |
| Material particulado (Oscurecimiento ligero) <sup>1</sup> | 30 partículas por contenedor                  | NT                                            | NT                                            | 87 partículas por contenedor                  | NT                                            | 118 partículas por contenedor                 |
|                                                           | 11 partículas por contenedor                  | NT                                            | NT                                            | 3 partículas por contenedor                   | NT                                            | 7 partículas por contenedor                   |
| Endotoxina bacteriana (Turbidimétrico cinético)           | < 0,35 EU/ml                                  | NT                                            | NT                                            | < 0,35 EU/ml                                  | NT                                            | < 0,35 EU/ml                                  |

Tabla 6 (cont.)

| Parámetro                                       | Inicial                                        | 15 meses                                       | 18 meses                                       | 21 meses                                       | 24 meses                                       |
|-------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Referencia de cuaderno de notas                 | 1245-6-46                                      | 1245-14-36                                     | 1245-14-49                                     | 1245-14-59                                     | 1245-14-76                                     |
| Apariencia                                      | Solución clara, incolora, libre de partículas. | Solución clara, incolora, libre de partículas. | Solución clara, incolora, libre de partículas. | Solución clara, incolora, libre de partículas. | Solución clara, incolora, libre de partículas. |
| Ensayo (Potencia)                               | 98,1 %                                         | 96,8 %                                         | 96,9 %                                         | 96,3 %                                         | 94,6 %                                         |
| Total de sustancias relacionadas                | 2 %                                            | 4 %                                            | 5 %                                            | 6 %                                            | 6 %                                            |
| Sustancias relacionadas individuales            |                                                |                                                |                                                |                                                |                                                |
| (DACH) Pt-diacuo (~RRT 0,3)                     | 0,16 %                                         | 0,13 %                                         | 0,12 %                                         | 0,11 %                                         | 0,11 %                                         |
| (DACH) Pt-monoacuo (~RRT 0,7)                   | 0,84 %                                         | 0,92 %                                         | 0,78 %                                         | 1,13 %                                         | 0,85 %                                         |
| (DACH) Pt-dicloruro (RRT 1,3-1,6)               | ND                                             | ND                                             | ND                                             | ND                                             | ND                                             |
| RRT 3,1-3,2                                     | 0,11 %                                         | 0,78 %                                         | 0,73 %                                         | 0,75 %                                         | 0,72 %                                         |
| Dímero de PT-112 (~ RRT 4,0)                    | 0,34 %                                         | 0,28 %                                         | 0,29 %                                         | 0,28 %                                         | 0,28 %                                         |
| RRT 0,42                                        | ND                                             | 0,12 %                                         | 0,15 %                                         | 0,16 %                                         | 0,18 %                                         |
| RRT 0,46                                        | ND                                             | 0,08 %                                         | 0,13 %                                         | 0,12 %                                         | 0,12 %                                         |
| RRT 0,50                                        | 0,06 %                                         | 0,44 %                                         | 0,59 %                                         | 0,60 %                                         | 0,70 %                                         |
| RRT 0,56                                        | 0,08 %                                         | 0,20 %                                         | 0,09 %                                         | 0,17 %                                         | 0,17 %                                         |
| RRT 0,68                                        | 0,09 %                                         | 0,11 %                                         | 0,08 %                                         | 0,12 %                                         | 0,13 %                                         |
| RRT 0,86                                        | ND                                             | 0,05 %                                         | 0,05 %                                         | ND                                             | 0,05 %                                         |
| RRT 3,29                                        | ND                                             | ND                                             | ND                                             | ND                                             | 0,06 %                                         |
| RRT 3,41                                        | ND                                             | ND                                             | ND                                             | 0,07 %                                         | ND                                             |
| RRT 3,44                                        | ND                                             | ND                                             | 0,12 %                                         | 0,05 %                                         | 0,05 %                                         |
| RRT 3,58                                        | ND                                             | 0,78 %                                         | 1,06 %                                         | 1,12 %                                         | 1,07 %                                         |
| RRT 4,95                                        | ND                                             | 0,51 %                                         | 0,69 %                                         | 0,89 %                                         | 1,12 %                                         |
| pH                                              | 7,4                                            | 7,5                                            | 7,5                                            | 7,4                                            | 7,4                                            |
| Esterilidad                                     | Estéril                                        | NT                                             | NT                                             | NT                                             | TBD                                            |
| Material particulado (Oscurecimiento ligero)    | 30 partículas por contenedor                   | NT                                             | NT                                             | NT                                             | TBD                                            |
|                                                 | 11 partículas por contenedor                   | NT                                             | NT                                             | NT                                             | TBD                                            |
| Endotoxina bacteriana (Turbidimétrico cinético) | < 0,35 EU/ml                                   | NT                                             | NT                                             | NT                                             | TBD                                            |

Tabla 7

Estabilidad de la formulación acuosa lista para usar de (R,R)-pirodach-2 a 2-8 °C (5 mg/ml de (R,R)-pirodach-2 en 10 mM de amortiguador de fosfato de potasio a un pH de 7,4) en viales de 10 ml

| Parámetro                                       | Inicial                                        | 1 mes                                          | 3 meses                                        | 6 meses                                        | 9 meses                                        | 12 meses                                       |
|-------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Apariencia                                      | Solución clara, incolora, libre de partículas. | Solución clara, incolora, libre de partículas. | Solución clara, incolora, libre de partículas. | Solución clara, incolora, libre de partículas. | Solución clara, incolora, libre de partículas. | Solución clara, incolora, libre de partículas. |
| Ensayo (Potencia)                               | 98,1 %                                         | 98,7 %                                         | 99,7 %                                         | 98,2 %                                         | 100,2 %                                        | 98,7 %                                         |
| Total de sustancias relacionadas                | 2 %                                            | 2 %                                            | 2 %                                            | 2 %                                            | 2 %                                            | 2 %                                            |
| (DACH) Pt-diacuo (~RRT 0,3)                     | 0,16 %                                         | 0,15 %                                         | 0,14 %                                         | 0,17 %                                         | 0,14 %                                         | 0,12 %                                         |
| (DACH) Pt-monoacuo (~RRT 0,7)                   | 0,84 %                                         | 1,04 %                                         | 0,92 %                                         | 0,28 %                                         | 0,81 %                                         | 0,96 %                                         |
| (DACH) Pt-dicloruro (RRT 1,3-1,6)               | ND                                             | ND                                             | ND                                             | ND                                             | ND                                             | ND                                             |
| RRT 3,1-3,2                                     | 0,11 %                                         | 0,13 %                                         | 0,25 %                                         | 0,38 %                                         | 0,39 %                                         | 0,48 %                                         |
| Dímero de PT-112 (~ RRT 4,0)                    | 0,34 %                                         | 0,33 %                                         | 0,37 %                                         | 0,36 %                                         | 0,33 %                                         | 0,34 %                                         |
| RRT 0,46                                        | ND                                             | ND                                             | ND                                             | 0,06 %                                         | 0,05 %                                         | ND                                             |
| RRT 0,50                                        | 0,06 %                                         | 0,06 %                                         | 0,06 %                                         | 0,18 %                                         | 0,18 %                                         | 0,15 %                                         |
| RRT 0,56                                        | 0,08 %                                         | 0,10 %                                         | 0,12 %                                         | 0,06 %                                         | 0,07 %                                         | 0,16 %                                         |
| RRT 0,68                                        | 0,09 %                                         | 0,19 %                                         | 0,11 %                                         | 0,16 %                                         | 0,08 %                                         | 0,11 %                                         |
| RRT 0,86                                        | ND                                             | 0,05 %                                         | ND                                             | 0,05 %                                         | 0,05 %                                         | 0,05 %                                         |
| RRT 3,58                                        | ND                                             | ND                                             | ND                                             | ND                                             | 0,07 %                                         | ND                                             |
| pH                                              | 7,4                                            | 7,4                                            | 7,4                                            | 7,4                                            | 7,4                                            | 7,4                                            |
| Esterilidad                                     | Estéril                                        | NT                                             | NT                                             | Estéril                                        | NT                                             | Estéril                                        |
| Material particulado (Oscurecimiento ligero)    | 30 partículas por contenedor                   | NT                                             | NT                                             | 83 partículas por contenedor                   | NT                                             | 124 partículas por contenedor                  |
|                                                 | 11 partículas por contenedor                   | NT                                             | NT                                             | 1 partículas por contenedor                    | NT                                             | 6 partículas por contenedor                    |
| Endotoxina bacteriana (Turbidimétrico cinético) | < 0,35 EU/ml                                   | NT                                             | NT                                             | < 0,35 EU/ml                                   | NT                                             | < 0,35 EU/ml                                   |

ND = No detectado, o <0,05 % del área  
NT = No probado

Tabla 7 (cont.)

| Parámetro                                       | Inicial                                        | 15 meses                                       | 18 meses                                       | 21 meses                                       | 24 meses                                       |
|-------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Apariencia                                      | Solución clara, incolora, libre de partículas. | Solución clara, incolora, libre de partículas. | Solución clara, incolora, libre de partículas. | Solución clara, incolora, libre de partículas. | Solución clara, incolora, libre de partículas. |
| Ensayo (Potencia)                               | 98,1 %                                         | 98,0 %                                         | 97,5 %                                         | 97,4 %                                         | 96,5 %                                         |
| Total de sustancias relacionadas                | 2 %                                            | 3 %                                            | 2 %                                            | 3 %                                            | 3 %                                            |
| (DACH) Pt-diacuo (~RRT 0,3)                     | 0,16 %                                         | 0,14 %                                         | 0,13 %                                         | 0,12 %                                         | 0,11 %                                         |
| (DACH) Pt-monoacuo (~RRT 0,7)                   | 0,84 %                                         | 0,94 %                                         | 0,76 %                                         | 1,07 %                                         | 0,93 %                                         |
| (DACH) Pt-dicloruro (RRT 1,3-1,6)               | ND                                             | ND                                             | ND                                             | ND                                             | ND                                             |
| RRT 3,1-3,2                                     | 0,11 %                                         | 0,59 %                                         | 0,58 %                                         | 0,67 %                                         | 0,65 %                                         |
| Dímero de PT-112 (~ RRT 4,0)                    | 0,34 %                                         | 0,34 %                                         | 0,33 %                                         | 0,35 %                                         | 0,33 %                                         |
| RRT 0,46                                        | ND                                             | ND                                             | 0,09 %                                         | 0,07 %                                         | 0,08 %                                         |
| RRT 0,50                                        | 0,06 %                                         | 0,16 %                                         | 0,26 %                                         | 0,23 %                                         | 0,25 %                                         |
| RRT 0,56                                        | 0,08 %                                         | 0,17 %                                         | 0,06 %                                         | 0,12 %                                         | 0,12 %                                         |
| RRT 0,68                                        | 0,09 %                                         | 0,12 %                                         | 0,08 %                                         | 0,14 %                                         | 0,11 %                                         |
| RRT 0,86                                        | ND                                             | 0,06 %                                         | 0,05 %                                         | 0,05 %                                         | 0,06 %                                         |
| RRT 3,58                                        | ND                                             | 0,07 %                                         | 0,10 %                                         | 0,10 %                                         | 0,14 %                                         |
| pH                                              | 7,4                                            | 7,4                                            | 7,4                                            | 7,4                                            | 7,4                                            |
| Esterilidad                                     | Estéril                                        | NT                                             | NT                                             | NT                                             | TBD                                            |
| Material particulado (Oscurecimiento ligero)    | 30 partículas por contenedor                   | NT                                             | NT                                             | NT                                             | TBD                                            |
|                                                 | 11 partículas por contenedor                   | NT                                             | NT                                             | NT                                             | TBD                                            |
| Endotoxina bacteriana (Turbidimétrico cinético) | < 0,35 EU/ml                                   | NT                                             | NT                                             | NT                                             | TBD                                            |

ND = No detectado, o <0,05 % del área  
NT = No probado

Los datos de estabilidad de un lote de 5 mg/ml de (R,R)-pirodach-2 en 10 mM de amortiguador de bicarbonato (pH de 8,6) a 25 °C/60 % de RH, 2-8 °C y -20 °C se resumen en la Tabla 8, Tabla 9 y Tabla 10, respectivamente.

Sorprendentemente, se descubrió que la adición de una pequeña cantidad de ion pirofosfato mejora de gran manera la estabilidad térmica de formulaciones acuosas listas para usar de (R,R)-pirodach-2. La adición no solo retrasa la velocidad de degradación como una función de la temperatura, sino que también sirve para disminuir la concentración de varias impurezas, que incluyen

(DACH)Pt-Cl<sub>2</sub>, una impureza que puede estar presente en (R,R)-pirodach-2 en función de la ruta de fabricación (WO2013176764 A1), dímero de (R,R)-pirodach-2, y la impureza que se forma en (R,R)-pirodach-2 formulada en amortiguador de fosfato y se eluye en RRT ~ 3,1-3,2 en el sistema de HPLC descrito en el Ejemplo 3.

La capacidad del pirofosfato agregado de reducir la concentración del dímero de (R,R)-pirodach-2 es particularmente ventajosa porque esta impureza se forma fácilmente en solución acuosa de (R,R)-pirodach-2 debajo de 7, es altamente insoluble, y puede, en concentraciones muy bajas, precipitarse de soluciones acuosas de (R,R)-pirodach-2. Por ejemplo, en una formulación lista para usar de 5 mg/ml de (R,R)-pirodach-2 fabricada de acuerdo con el Ejemplo 6 donde la concentración inicial de dímero de (R,R)-pirodach-2 era de ~0,6 % de área, se observó que el dímero comenzaba a precipitarse como un sólido cristalino entre los 6 y 9 meses de almacenamiento a 2-8 °C, y se observó cristalización en todos los viales de muestra a los 12 meses de almacenamiento.

Tabla 8

Estabilidad de la formulación acuosa lista para usar de (R,R)-pirodach-2 a 25 °C/60 % de RH  
(5 mg/ml de (R,R)-pirodach-2 en 10 mM de amortiguador de bicarbonato a un pH de 8,6) en viales de 10 ml

| Parámetro              | Inicial                                | 1 semana                               | 2 semanas                              | 3 semanas                              | 1 mes                                  | 2 meses                                | 3 meses                                | 4 meses                                | 6 meses                                | 9 meses                                | 12 meses                               |
|------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| Apariencia             | Solución clara sin partículas visibles | Solución clara sin partículas visibles | Solución clara sin partículas visibles | Solución clara sin partículas visibles | Solución clara sin partículas visibles | Solución clara sin partículas visibles | Solución clara sin partículas visibles | Solución clara sin partículas visibles | Solución clara sin partículas visibles | Solución clara sin partículas visibles | Solución clara sin partículas visibles |
| Potencia (ensayo)      | 100.3%                                 | 101.7%                                 | 99.9%                                  | 100.3%                                 | 98.9%                                  | 100.4%                                 | 101.6%                                 | 103.0%                                 | 99.2%                                  | 100.3%                                 | 98.4%                                  |
| Pureza (% de área)     | 98.04%                                 | 97.74%                                 | 97.77%                                 | 97.33%                                 | 97.44%                                 | 96.45%                                 | 96.08%                                 | 95.98%                                 | 95.03%                                 | 93.82%                                 | 92.23%                                 |
| Impurezas desconocidas |                                        |                                        |                                        |                                        |                                        |                                        |                                        |                                        |                                        |                                        |                                        |
| RRT ~ 0.29             | 0.11%                                  | 0.11%                                  | 0.12%                                  | 0.16%                                  | 0.16%                                  | 0.19%                                  | 0.27%                                  | 0.16%                                  | 0.22%                                  | 0.15%                                  | 0.14%                                  |
| RRT ~ 0.42             | ND                                     | 0.05%                                  | 0.10%                                  | 0.15%                                  | 0.21%                                  | 0.56%                                  | 0.76%                                  | 0.96%                                  | 1.29%                                  | 1.88%                                  | 2.20%                                  |
| RRT ~ 0.49             | 0.62%                                  | 0.78%                                  | 0.77%                                  | 0.76%                                  | 0.75%                                  | 0.79%                                  | 0.78%                                  | 0.94%                                  | 0.80%                                  | 0.84%                                  | 0.86%                                  |
| RRT ~ 0.59             | ND                                     | 0.06%                                  | ND                                     | 0.12%                                  | 0.15%                                  | 0.26%                                  | 0.25%                                  | 0.17%                                  | 0.32%                                  | 0.32%                                  | 0.32%                                  |
| RRT ~ 0.73             | 1.05%                                  | 1.12%                                  | 1.17%                                  | 1.26%                                  | 1.03%                                  | 0.97%                                  | 0.92%                                  | 0.73%                                  | 0.82%                                  | 0.43%                                  | 0.97%                                  |
| RRT ~ 1.82             | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | 0.05%                                  | 0.06%                                  |
| RRT ~ 2.85             | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | 0.12%                                  | 0.17%                                  | 0.17%                                  | 0.15%                                  | 0.32%                                  | 0.37%                                  |
| RRT ~ 3.00             | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | 0.07%                                  | ND                                     | 0.06%                                  |
| RRT ~ 3.15             | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | 0.07%                                  | 0.06%                                  |
| RRT ~ 3.30             | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | 0.05%                                  | 0.10%                                  | 0.12%                                  |
| RRT ~ 3.45             | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | 0.05%                                  | ND                                     | ND                                     | ND                                     | 0.06%                                  | 0.05%                                  |
| RRT ~ 3.74             | ND                                     | ND                                     | ND                                     | 0.06%                                  | 0.08%                                  | 0.31%                                  | 0.40%                                  | 0.58%                                  | 0.69%                                  | 0.88%                                  | 1.07%                                  |
| RRT ~ 4.27             | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | 0.06%                                  | 0.06%                                  | 0.08%                                  | 0.13%                                  | 0.15%                                  |
| RRT ~ 4.99             | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | 0.07%                                  | 0.14%                                  | 0.20%                                  | 0.36%                                  | 0.66%                                  | 1.02%                                  |
| pH                     | 8.60                                   | 8.57                                   | 8.64                                   | 8.67                                   | 8.68                                   | 8.73                                   | 9.01                                   | 8.90                                   | 8.93                                   | 9.08                                   | 9.07                                   |

ND = No detectado, o < 0.05%; NT = No eval.; RRT = Tiempo de retención relativo

Tabla 9

Estabilidad de la formulación acuosa lista para usar de (R,R)-  
pirodach-2 a 2-8 °C  
(5 mg/ml de (R,R)-pirodach-2 en 10 mM de amortiguador de  
bicarbonato a un pH de 8,6) en viales de 10 ml

| Parámetro              | Inicial                                | 1 semana                               | 2 semanas                              | 3 semanas                              | 1 mes                                  | 2 meses                                | 3 meses                                | 4 meses                                | 6 meses                                | 9 meses                                | 12 meses                               |
|------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| Apariencia             | Solución clara sin partículas visibles | Solución clara sin partículas visibles | Solución clara sin partículas visibles | Solución clara sin partículas visibles | Solución clara sin partículas visibles | Solución clara sin partículas visibles | Solución clara sin partículas visibles | Solución clara sin partículas visibles | Solución clara sin partículas visibles | Solución clara sin partículas visibles | Solución clara sin partículas visibles |
| Potencia (ensayo)      | 100.3%                                 | 101.9%                                 | 100.5%                                 | 100.0%                                 | 99.1%                                  | 102.4%                                 | 102.3%                                 | 103.5%                                 | 100.4%                                 | 102.2%                                 | 100.3%                                 |
| Pureza (% de área)     | 98.04%                                 | 98.02%                                 | 97.99%                                 | 97.91%                                 | 97.85%                                 | 97.58%                                 | 97.76%                                 | 98.07%                                 | 97.56%                                 | 97.73%                                 | 96.64%                                 |
| Impurezas desconocidas |                                        |                                        |                                        |                                        |                                        |                                        |                                        |                                        |                                        |                                        |                                        |
| RRT ~ 0.29             | 0.11%                                  | 0.10%                                  | 0.12%                                  | 0.14%                                  | 0.14%                                  | 0.21%                                  | 0.29%                                  | 0.15%                                  | 0.23%                                  | 0.15%                                  | 0.13%                                  |
| RRT ~ 0.35             | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | 0.05%                                  |
| RRT ~ 0.41             | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | 0.05%                                  | 0.11%                                  | 0.13%                                  | 0.16%                                  | 0.23%                                  | 0.33%                                  | 0.47%                                  |
| RRT ~ 0.49             | 0.62%                                  | 0.60%                                  | 0.63%                                  | 0.56%                                  | 0.55%                                  | 0.62%                                  | 0.53%                                  | 0.68%                                  | 0.65%                                  | 0.58%                                  | 0.64%                                  |
| RRT ~ 0.59             | ND                                     | ND                                     | 0.06%                                  | 0.07%                                  | 0.08%                                  | 0.15%                                  | 0.15%                                  | 0.09%                                  | 0.21%                                  | 0.24%                                  | 0.27%                                  |
| RRT ~ 0.73             | 1.05%                                  | 1.11%                                  | 1.14%                                  | 1.11%                                  | 1.14%                                  | 1.03%                                  | 0.89%                                  | 0.72%                                  | 0.90%                                  | 0.43%                                  | 0.98%                                  |
| RRT ~ 1.51             | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | 0.06%                                  | 0.05%                                  | ND                                     | 0.05%                                  | ND                                     |
| RRT ~ 2.82             | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | 0.05%                                  | 0.05%                                  | ND                                     | 0.13%                                  | 0.19%                                  |
| RRT ~ 3.44             | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | ND                                     | 0.06%                                  | ND                                     | ND                                     | 0.09%                                  | 0.16%                                  | 0.28%                                  |
| pH                     | 8.60                                   | 8.57                                   | 8.65                                   | 8.67                                   | 8.73                                   | 8.76                                   | 8.95                                   | 8.83                                   | 8.84                                   | 9.07                                   | 8.97                                   |

ND = No detectado, o < 0.05%; NT = No eval. ; RRT = Tiempo de retención relativo

Tabla 10

Estabilidad de la formulación acuosa lista para usar de (R,R)-pirodach-2 a -20°C  
(5 mg/ml de (R,R)-pirodach-2 en 10 mM de amortiguador de bicarbonato a un pH de 8,6) en viales de 10 ml

| Parámetro              | Inicial                                | 1 semana | 2 semanas | 3 semanas | 1 mes                                            | 2 meses | 3 meses | 4 meses | 6 meses                                                                       | 9 meses | 12 meses                                                                      |
|------------------------|----------------------------------------|----------|-----------|-----------|--------------------------------------------------|---------|---------|---------|-------------------------------------------------------------------------------|---------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Appearance             | Solución clara sin partículas visibles | NT       | NT        | NT        | Solución amarilla pálida sin partículas visibles | NT      | NT      | NT      | Solución clara sin precipitación amarilla después del equilibrio <sup>1</sup> | NT      | Solución clara sin precipitación amarilla después del equilibrio <sup>2</sup> |
| Potencia (ensayo)      | 100.3%                                 | NT       | NT        | NT        | 97.5%                                            | NT      | NT      | NT      | 98.4%                                                                         | NT      | 86.1%                                                                         |
| Pureza (% de área)     | 98.04%                                 | NT       | NT        | NT        | 97.08%                                           | NT      | NT      | NT      | 96.36%                                                                        | NT      | 90.94%                                                                        |
| Impurezas desconocidas |                                        |          |           |           |                                                  |         |         |         |                                                                               |         |                                                                               |
| RRT ~ 0.29             | 0.11%                                  | NT       | NT        | NT        | 0.16%                                            | NT      | NT      | NT      | 0.23%                                                                         | NT      | 0.13%                                                                         |
| RRT ~ 0.41             | ND                                     | NT       | NT        | NT        | 0.07%                                            | NT      | NT      | NT      | 0.45%                                                                         | NT      | 5.26%                                                                         |
| RRT ~ 0.44             | ND                                     | NT       | NT        | NT        | 0.09%                                            | NT      | NT      | NT      | ND                                                                            | NT      | ND                                                                            |
| RRT ~ 0.49             | 0.62%                                  | NT       | NT        | NT        | 0.94%                                            | NT      | NT      | NT      | 1.41%                                                                         | NT      | 1.19%                                                                         |
| RRT ~ 0.59             | ND                                     | NT       | NT        | NT        | 0.09%                                            | NT      | NT      | NT      | 0.15%                                                                         | NT      | 0.27%                                                                         |
| RRT ~ 0.62             | ND                                     | NT       | NT        | NT        | 0.12%                                            | NT      | NT      | NT      | ND                                                                            | NT      | 0.43%                                                                         |
| RRT ~ 0.73             | 1.05%                                  | NT       | NT        | NT        | 1.12%                                            | NT      | NT      | NT      | 0.84%                                                                         | NT      | 0.88%                                                                         |
| RRT ~ 1.69             | ND                                     | NT       | NT        | NT        | ND                                               | NT      | NT      | NT      | 0.22%                                                                         | NT      | 0.25%                                                                         |
| RRT ~ 2.96             | ND                                     | NT       | NT        | NT        | ND                                               | NT      | NT      | NT      | ND                                                                            | NT      | 0.08%                                                                         |
| RRT ~ 3.02             | ND                                     | NT       | NT        | NT        | ND                                               | NT      | NT      | NT      | ND                                                                            | NT      | 0.09%                                                                         |
| RRT ~ 3.12             | ND                                     | NT       | NT        | NT        | 0.05%                                            | NT      | NT      | NT      | 0.08%                                                                         | NT      | 0.05%                                                                         |
| RRT ~ 3.24             | ND                                     | NT       | NT        | NT        | ND                                               | NT      | NT      | NT      | ND                                                                            | NT      | 0.06%                                                                         |
| RRT ~ 3.30             | ND                                     | NT       | NT        | NT        | 0.05%                                            | NT      | NT      | NT      | 0.06%                                                                         | NT      | 0.13%                                                                         |
| RRT ~ 3.33             | ND                                     | NT       | NT        | NT        | 0.06%                                            | NT      | NT      | NT      | 0.05%                                                                         | NT      | 0.06%                                                                         |
| RRT ~ 3.70             | ND                                     | NT       | NT        | NT        | ND                                               | NT      | NT      | NT      | ND                                                                            | NT      | 0.09%                                                                         |
| RRT ~ 4.02             | ND                                     | NT       | NT        | NT        | 0.08%                                            | NT      | NT      | NT      | 0.09%                                                                         | NT      | 0.14%                                                                         |
| pH                     | 8.60                                   | NT       | NT        | NT        | 8.77                                             | NT      | NT      | NT      | 8.72                                                                          | NT      | 8.83                                                                          |

ND = No detectado, o < 0.05%; NT = No eval. ; RRT = Tiempo de retención relativo  
<sup>1</sup> Pareció resolubilizarse con agitación manual y breve ultrasonido  
<sup>2</sup> No pudo resolubilizarse con agitación manual y breve ultrasonido

La comparación de los datos de estabilidad para una concentración de 5 mg/ml de una solución de (R,R)-pirodach-2 en 10 mM de un amortiguador de fosfato potásico ajustado a un pH de 7,0 - 7,5 a 25 °C/60 % de RH en la Tabla 4 con la de una formulación de una misma concentración que contiene ~0,5 equivalentes molares de pirofosfato agregado en la Tabla 11, muestra que la adición de ion pirofosfato retarda considerablemente la velocidad de degradación de (R,R)-pirodach-2, de modo que la estabilidad de la formulación con pirofosfato a 25 °C es comparable/superior a la de la formulación sin el pirofosfato agregado almacenado en condiciones de refrigeración. Los datos de estabilidad en la formulación con pirofosfato agregado a 40 °C/75 % de RH en la Tabla 12 son aún más considerables. Se utilizaron estudios cinéticos/de diseño de experimento para demostrar el efecto del pirofosfato en formulaciones acuosas amortiguadas listas para usar de (R,R)-pirodach-2 (Ejemplo 9).

Los datos demuestran además que la adición de una sal amortiguadora tal como fosfato o carbonato/bicarbonato es innecesaria para lograr el control del pH; más bien, la capacidad amortiguadora del pirofosfato en el rango de pH fisiológico es suficiente para controlar el pH en una formulación acuosa de (R,R)-pirodach-2. Desde una perspectiva clínica, es deseable mantener la cantidad de ion pirofosfato en una formulación acuosa de (R,R)-pirodach-2 al mínimo. Se descubrió que una relación de 1 equivalente molar de ion pirofosfato con respecto a (R,R)-pirodach-2 proporciona una estabilidad suficiente a las soluciones acuosas de (R,R)-pirodach-2 a un pH fisiológico tal que una formulación lista para usar formulada tendría una vida comercial útil de varios años en almacenamiento a razón de las condiciones estándar de almacenamiento a largo plazo del Comité Internacional de Armonización (ICH) de 25 °C/60 % de RH (es decir, temperatura

ambiente). Más óptimamente, se descubrió que una relación molar de ~0,5 moles de ion pirofosfato con respecto a (R,R)-pirodach-2 proporciona una estabilidad aceptable para una formulación acuosa lista para usar de (R,R)-pirodach-2. Con máxima preferencia, la formulación consiste en una solución acuosa de 5 mg/ml de (R,R)-pirodach-2 en pirofosfato ajustado a un pH de 7-7,5. Además, las inclusiones de ion pirofosfato en la formulación, o como el agente amortiguador exclusivo, eliminan el potencial de precipitación de impurezas y, en particular, la muy insoluble impureza de dímero de (R,R)-pirodach-2 de una formulación acuosa lista para usar de (R,R)-pirodach-2.

Tabla 11

Estabilidad de la formulación acuosa lista para usar de (R,R)-pirodach-2 a 25 °C/60 % de RH  
(5 mg/ml de (R,R)-pirodach-2 en 10 mM de amortiguador de fosfato de sodio, 5,2 mM de pirofosfato de sodio a un pH de 7,5) en viales de 10 ml

| Parámetro                            | Inicial                                     | 1 mes                                       | 2 meses                                     | 3 meses                                     | 6 meses                                     | 9 meses                                     |
|--------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Apariencia                           | Solución incolora clara libre de partículas | Solución incolora clara libre de partículas | Solución incolora clara libre de partículas | Solución incolora clara libre de partículas | Solución incolora clara libre de partículas | Solución incolora clara libre de partículas |
| Potencia (ensayo)                    | 102.0%                                      | 102.2%                                      | 103.8%                                      | 101.4%                                      | 102.8%                                      | 101.7%                                      |
| Sustancias relacionadas individuales |                                             |                                             |                                             |                                             |                                             |                                             |
| RRT 0.28-0.29                        | 0.14%                                       | 0.10%                                       | 0.20%                                       | 0.17%                                       | 0.17%                                       | 0.18%                                       |
| RRT 0.50-0.51                        | 0.08%                                       | 0.08%                                       | 0.15%                                       | 0.11%                                       | 0.12%                                       | 0.21%                                       |
| RRT 0.58                             | 0.34%                                       | 0.39%                                       | 0.38%                                       | 0.43%                                       | 0.44%                                       | 0.42%                                       |
| RRT 0.73-0.74                        | 0.83%                                       | 0.71%                                       | 0.92%                                       | 0.88%                                       | 0.81%                                       | 0.27%                                       |
| RRT 0.92                             | 0.05%                                       | ND                                          | ND                                          | ND                                          | ND                                          | ND                                          |
| RRT 1.57                             | 0.12%                                       | ND                                          | ND                                          | ND                                          | ND                                          | ND                                          |
| Dímero de PT-112                     | 0.16%                                       | ND                                          | ND                                          | ND                                          | ND                                          | ND                                          |
| Sustancias relacionadas totales      | 1.7%                                        | 1.3%                                        | 1.6%                                        | 1.6%                                        | 1.5%                                        | 1.20%                                       |
| pH                                   | 7.5                                         | 7.6                                         | 7.6                                         | 7.6                                         | 7.6                                         | 7.6                                         |

Tabla 12

Estabilidad de la formulación acuosa lista para usar de (R,R)-pirodach-2 a 40 °C/75 % de RH

(5 mg/ml de (R,R)-pirodach-2 en 10 mM de amortiguador de fosfato de sodio, 5,2 mM de pirofosfato de sodio a un pH de 7,5) en viales de 10 ml

| Parámetro                            | Inicial                                     | 1 mes                                       | 2 meses                                     | 3 meses                                     | 6 meses                                     |
|--------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Apariencia                           | Solución incolora clara libre de partículas | Solución incolora clara libre de partículas | Solución incolora clara libre de partículas | Solución incolora clara libre de partículas | Solución incolora clara libre de partículas |
| Potencia (ensayo)                    | 102.0%                                      | 101.6%                                      | 103.8%                                      | 101.5%                                      | 102.8%                                      |
| Sustancias relacionadas individuales |                                             |                                             |                                             |                                             |                                             |
| RRT 0.28-0.29                        | 0.14%                                       | 0.10%                                       | 0.19%                                       | 0.16%                                       | 0.17%                                       |
| RRT 0.50-0.51                        | 0.08%                                       | 0.10%                                       | 0.19%                                       | 0.16%                                       | 0.22%                                       |
| RRT 0.58                             | 0.34%                                       | 0.41%                                       | 0.41%                                       | 0.48%                                       | 0.47%                                       |
| RRT 0.73-0.74                        | 0.83%                                       | 0.68%                                       | 0.88%                                       | 0.86%                                       | 0.81%                                       |
| RRT 0.92                             | 0.05%                                       | ND                                          | ND                                          | ND                                          | ND                                          |
| RRT 1.57                             | 0.12%                                       | ND                                          | ND                                          | ND                                          | ND                                          |
| RRT 3.66-3.71                        | ND                                          | ND                                          | 0.07%                                       | 0.11%                                       | 0.18%                                       |
| Dímero de PT-112                     | 0.16%                                       | ND                                          | ND                                          | ND                                          | ND                                          |
| Sustancias relacionadas totales      | 1.7%                                        | 1.3%                                        | 1.7%                                        | 1.8%                                        | 1.9%                                        |
| pH                                   | 7.5                                         | 7.6                                         | 7.6                                         | 7.5                                         | 7.5                                         |

Se mostró en el siguiente experimento la evidencia de que el pirofosfato agregado revierte la formación de dímero de PT-112 en formulaciones acuosas de PT-112. Se preparó una solución acuosa de 5 mg/ml de PT-112 al disolver PT-112 en 10 mM de un amortiguador de fosfato de potasio que contenía hidróxido de potasio agregado, de manera que el pH de la solución final era de ~6,5. La solución se dejó agitar a temperatura ambiente durante alrededor de 24 horas, tiempo durante el cual el nivel de dímero de PT-112 aumentó desde alrededor de 0,33 % en el API hasta alrededor de 1,02 % en la solución formulada. En el ajuste posterior de pH de una porción de la solución a un ~pH 7,5 con hidróxido de potasio, se observó que la concentración de dímero disminuyó progresivamente a lo largo

de un período de 7 días a temperatura ambiente conjuntamente con un aumento correspondiente de la impureza RRT 3,1-3,2. Sin embargo, en el pH de una porción de la solución con hidróxido de potasio a ~pH 7,5 y la adición de 0,5 eq. de pirofosfato, se observó que el nivel de dímero disminuyó progresivamente hasta un nivel efectivamente no detectable después de 9 días a temperatura ambiente. La disminución no estuvo acompañada por la formación de la impureza RRT 3,1-3,2; ni por la formación de nuevas impurezas; más bien se observó un aumento en la concentración de PT-112.

### **Ejemplo 1**

#### Impacto de la resistencia del amortiguador

Preparación de la solución amortiguadora.

##### 10 mM de fosfato de sodio, pH de 7

- 200 ml de 10 mM de fosfato de sodio, dibásico ajustado con
- ~177 ml de 10 mM de fosfato de sodio, monobásico
- pH final de 7,02

##### 100 mM de fosfato de sodio, pH de 7

- 200 ml de 100 mM de fosfato de sodio, dibásico y ajustado con
- ~138 ml de 100 mM de fosfato de sodio, monobásico
- pH final de 6,98

##### 10 mM de fosfato de potasio, pH de 7

- 200 ml de 10 mM de fosfato de potasio, dibásico ajustado con
- ~126 ml de 10 mM de fosfato de potasio, monobásico
- pH final de 7,01

##### 100 mM de fosfato de potasio, pH de 7

- 200 ml de 100 mM de fosfato de potasio, dibásico ajustado

con ~125 ml de 10 mM de fosfato de potasio, monobásico  
-pH final de 7,02

10 mM de carbonato de sodio

-Sin ajuste de pH  
-pH final de 10,84

100 mM de carbonato de sodio

-Sin ajuste de pH  
-pH final de 11,39

10 mM de bicarbonato de sodio

-Sin ajuste de pH  
-pH final de 8,18

100 mM de bicarbonato de sodio

-Sin ajuste de pH  
-pH final de 8,06

(R,R)-pirodach-2 se disolvió en cada uno de estos amortiguadores para preparar en una solución de 1 mg/ml. Se monitoreó mediante HPLC la potencia de las soluciones tapadas almacenadas en cámaras de estabilidad controladas a 25 °C/60 % de RH y 40 °C/75 % de RH. Ver Figura 1 y Figura 2.

## **Ejemplo 2**

Impacto del pH en la estabilidad de la solución de amortiguador  
de fosfato

Preparación de la solución amortiguadora.

10 mM de fosfato de potasio, pH de 6,5

-50 ml de 10 mM de fosfato de potasio, dibásico ajustado con

~145 ml de 10 mM de fosfato de potasio, monobásico

-pH final de 6,50

10 mM de fosfato de potasio, pH de 7

-200 ml de 10 mM de fosfato de potasio, dibásico ajustado con

~126 ml de 10 mM de fosfato de potasio, monobásico

-pH final de 7,01

10 mM de fosfato de potasio, pH de 7,5

-50 ml de 10 mM de fosfato de potasio, dibásico ajustado con

~14 ml de 10 mM de fosfato de potasio, monobásico

-pH final de 7,50

10 mM de fosfato de potasio, pH de 8,0

-50 ml de 10 mM de fosfato de potasio, dibásico ajustado con

~4 ml de 10 mM de fosfato de potasio, monobásico

-pH final de 8,00

10 mM de fosfato de potasio, pH de 8,5

-50 ml de 10 mM de fosfato de potasio, dibásico ajustado con

~1 ml de 10 mM de fosfato de potasio, monobásico

-pH final de 8,49

10 mM de fosfato de potasio, pH de 9,0

-90 ml de 10 mM de fosfato de potasio, dibásico ajustado con

< 1 ml de 10 mM de fosfato de potasio, monobásico

-pH final de 9,02

(R,R)-pirodach-2 se disolvió en cada uno de estos amortiguadores para preparar en una solución de 1 mg/ml. Se

monitoreó mediante HPLC la potencia de las soluciones tapadas almacenadas en cámaras de estabilidad controladas a 25 °C/60 % de RH y 40 °C/75 % de RH a partir de lo cual se muestran, en las Figuras 3 y 4, respectivamente, los datos informados a T=3 días al respecto de una solución amortiguada a un pH de 7,0.

Ejemplo 3

Sistema de HPLC

| Parámetro                     | Condición                                      |
|-------------------------------|------------------------------------------------|
| Columna                       | Waters XSelect HSS T3, 4,6 mm x 100 mm, 3,5 µm |
| Volumen sistólico             | 100 µl                                         |
| Temperatura de la columna     | 10,0 °C ± 2,0 °C                               |
| Temperatura de la muestra     | Ambiente                                       |
| Fase móvil A:                 | 50 mM de fosfato de sodio, pH de 2,0           |
| Fase móvil B                  | 100 % de acetonitrilo                          |
| Diluyente                     | 20 mM de pirofosfato de sodio                  |
| Volumen de inyección          | 6 µl                                           |
| Tiempo de ejecución           | 24 minutos                                     |
| Longitud de onda de detección | 205 nm                                         |

| Tiempo (minutos) | Velocidad de flujo (ml/min) | % de fase móvil A | % de fase móvil B |
|------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|
| 0,00             | 1,5                         | 100,0             | 0,0               |
| 4,93             | 1,5                         | 100,0             | 0,0               |
| 14,53            | 1,5                         | 90,0              | 10,0              |
| 16,53            | 1,5                         | 100,0             | 0,0               |
| 24,00            | 1,5                         | 100,0             | 0,0               |

Ejemplo 4

Formulación lista para usar de 5 mg/ml de (R,R)-pirodach-2 en 10 mM de bicarbonato de sodio a un pH de 9,0-9,5 (protocolo de estabilidad de prototipo de (R,R)-pirodach-2 de Pharmatek)

- Transferir 1680,0 mg ± 0,5 mg de bicarbonato de sodio a un matraz volumétrico de 2 l.
- Llenar el matraz hasta alrededor del 75 % del volumen con

agua, agitar según sea necesario para disolver todos los sólidos.

- Transferir volumétricamente 32,0 ml de NaOH 1N al matraz.
- Diluir al volumen con agua y mezclar bien.
- Registrar el pH de la solución final. Este es el diluyente.
- Transferir 7653,1 mg  $\pm$  0,5 mg de (R,R)-pirodach-2 a un recipiente mezclador.
- Transferir 1500 mM del diluyente al recipiente y agitar para disolver los sólidos.
- Registrar el pH de la solución final.
- Pasar la solución completa a través de una membrana estéril de filtro de 0,22  $\mu$ m hacia un recipiente estéril de recolección.

- Calcular la concentración de la solución de (R,R)-pirodach-2

$$[(R,R)\text{-pirodach-2}], \text{ mg/ml} = \frac{\text{Peso de (R,R)-pirodach-2, mg} * \text{pureza de (R,R)-pirodach-2}}{1500 \text{ ml}}$$

- Realizar lo siguiente en una campana de flujo laminar; llenar los viales estériles de vidrio de borosilicato de Tipo 1 de 10 ml con un volumen de llenado de 10 ml, taponar los viales con tapones estériles de goma de 20 mm y engastar con tapones para encapsular de 20 mm.
- Colocar los viales en cámaras de estabilidad a 25 °C/60 % de RH, 2-8 °C y -20 °C. Método de HPLC en el Ejemplo 3 para controlar la pureza y las impurezas.

### **Ejemplo 5**

Formulación lista para usar de 15 mg/ml de (R,R)-pirodach-2

V es el volumen final requerido de solución a realizar

- Disolver V x 11,4 mg de fosfato de sodio, tribásico

(dodecahidrato) +  $V \times 4,26$  mg de sodio, dibásico (anhidro) en  $V$  ml de agua destilada. Agitar hasta que se disuelvan las sales amortiguadoras.

- Agregar a la solución amortiguadora agitada una cantidad de  $V \times 15$  mg de (R,R)-pirodach-2; agitar en un agitador magnético hasta que el sólido (R,R)-pirodach-2 se disuelva completamente (10 -30 minutos)
- Registrar el pH de la solución.
- Ajustar el pH, si es necesario, a 7,0 - 7,4, mediante la adición de  $V \times 1,8$  mg de fosfato de sodio, tribásico (dodecahidrato) con agitación para disolver; registrar el pH final.
- Para hacer una solución de (R,R)-pirodach-2 de una concentración más baja, diluir la solución anterior de 15 mg/ml de (R,R)-pirodach-2 con una cantidad adecuada del vehículo.

### **Ejemplo 6**

Formulación lista para usar de 5 mg/ml de (R,R)-pirodach-2 en 10 mM de fosfato de potasio a un pH de 7,2-7,5

- Transferir 4564,6 mg  $\pm$  0,5 mg de fosfato de potasio dibásico, trihidrato a un matraz volumétrico de 2 l.
- Llenar el matraz hasta alrededor del 75 % del volumen con agua, agitar según sea necesario para disolver todos los sólidos.
- Transferir volumétricamente 32,0 ml de KOH 1N al matraz.
- Diluir el matraz al volumen con agua y mezclar bien.
- Registrar el pH de la solución final. Este es el diluyente.
- Transferir 7653,1 mg  $\pm$  0,5 mg de (R,R)-pirodach-2 a un

recipiente mezclador.

- Transferir 1500 ml del diluyente al recipiente y agitar para disolver los sólidos.
- Registrar el pH de la solución final.
- Pasar la solución completa a través de una membrana estéril de filtro de 0,22 µm hacia un recipiente estéril de recolección.
- Calcular la concentración de la solución de (R,R)-pirodach-2

$$[(R,R)\text{-pirodach-2}], \text{ mg/ml} = \frac{\text{Peso de (R,R)-pirodach-2, mg} * \text{pureza de (R,R)-pirodach-2}}{1500 \text{ ml}}$$

### Ejemplo 7

Formulación lista para usar de 5 mg/ml de (R,R)-pirodach-2 en 10 mM de fosfato de sodio, 5,2 mM de pirofosfato de sodio a un pH de 7,5

- Transferir 1419,6 mg ± 14,0 mg de fosfato de sodio dibásico anhidro a un matraz volumétrico de 1 l.
- Transferir 2298,5 mg ± 23,0 mg de pirofosfato de tetrasodio decahidrato al mismo matraz volumétrico de 1 l.
- Llenar el matraz hasta alrededor del 75 % del volumen con agua estéril para inyección, agitar según sea necesario para disolver todos los sólidos.
- Transferir volumétricamente 8,0 ml de NaOH 1N al matraz.
- Diluir el matraz al volumen con agua y mezclar bien.
- Registrar el pH de la solución final. Este es el vehículo.
- Determinar el peso de tara de un recipiente de composición de 500 ml con barra de agitación.
- Transferir 2500,1 mg ± 25,0 mg de (R,R)-pirodach-2 al recipiente.

- Transferir 450,0 g  $\pm$  0,1 g del vehículo al recipiente y agitar para disolver los sólidos.
- Determinar el pH inicial de la solución.
- Ajustar lentamente el pH de la solución a 7,5  $\pm$  0,1 al agregar NaOH 1N adicional.
- Determinar el peso bruto de la solución y diluir el peso de la solución hasta 500,0 g  $\pm$  0,1 g al agregar un vehículo adicional en el recipiente mezclador. Densidad = 1,00 g/ml.
- Agitar la solución final durante 5 minutos adicionales.
- Determinar el pH de la solución final.
- Pasar la solución completa a través de un filtro Stericup PVDF de 0,22  $\mu$ m hacia un recipiente estéril de recolección.
- Realizar lo siguiente en una campana de flujo laminar; llenar los viales tubulares estériles de 10 ml con 10 ml de solución, taponados con un tapón estéril Flurotec, y engastados con un cierre hermético de apertura fácil.
- Colocar los viales en cámaras de estabilidad a 40 °C/75 % de RH y 25 °C/60 % de RH. Método de HPLC en el Ejemplo 3 para controlar la pureza y las impurezas.

### **Ejemplo 8**

Formulación lista para usar de 5 mg/ml de (R,R)-pirodach-2 en 5,2 mM de pirofosfato de sodio a un pH de 7,5

- Transferir 2298,5 mg  $\pm$  23,0 mg de pirofosfato de tetrasodio decahidrato a un matraz volumétrico de 1 l.
- Llenar el matraz hasta alrededor del 75 % del volumen con agua estéril para inyección, agitar según sea necesario para disolver todos los sólidos.
- Transferir volumétricamente 14,5 ml de NaOH 1N al matraz.
- Diluir el matraz al volumen con agua y mezclar bien.

- Registrar el pH de la solución final. Este es el vehículo.
- Determinar el peso de tara de un recipiente de composición de 500 ml con barra de agitación.
- Transferir 2500,1 mg  $\pm$  25,0 mg de (R,R)-pirodach-2 al recipiente.
- Transferir 450,0 g  $\pm$  0,1 g del vehículo al recipiente y agitar para disolver los sólidos.
- Determinar el pH inicial de la solución.
- Ajustar lentamente el pH de la solución a 7,5  $\pm$  0,1 al agregar NaOH 0,1N adicional.
- Determinar el peso bruto de la solución y diluir el peso de la solución hasta 500,0 g  $\pm$  0,1 g al agregar un vehículo adicional en el recipiente mezclador. Densidad = 1,00 g/ml.
- Agitar la solución final durante 5 minutos adicionales.
- Determinar el pH de la solución final.
- Pasar la solución completa a través de un filtro Stericup PVDF de 0,22  $\mu$ m hacia un recipiente estéril de recolección.
- Realizar lo siguiente en una campana de flujo laminar; llenar los viales tubulares estériles de 10 ml con 10 ml de solución, taponados con un tapón estéril Flurotec, y engastados con un cierre hermético de apertura fácil.
- Colocar los viales en cámaras de estabilidad a 40 °C/75 % de RH y 25 °C/60 % de RH. Método de HPLC en el Ejemplo 3 para controlar la pureza y las impurezas.

### **Ejemplo 9**

Estudio de diseño de experimento sobre la estabilización del ion pirofosfato

Las formulaciones utilizadas para el estudio de diseño de experimento se enumeran en la Tabla 11. La evaluación de

estabilidad bajo la temperatura altamente agobiante de 60 °C demuestra que la adición de cantidades muy pequeñas de ion pirofosfato, incluso tan poco como ~0,25 equivalente molar con respecto a la (R,R)-pirodach-2 presente, proporciona una disminución considerable de la velocidad global de degradación de (R,R)-pirodach-2 y de la aparición de impurezas. En particular, los datos muestran que el ion pirofosfato produce la desaparición progresiva de varias impurezas inicialmente presentes en la solución acuosa resultante de las impurezas en el (R,R)-pirodach-2 o que se han formado durante la preparación de la solución. Específicamente, la presencia de pirofosfato produce la rápida desaparición de la impureza del dímero de (R,R)-pirodach-2 y de la impureza RRT ~3,1-3,2.

Tabla 11

Formulaciones de diseño de experimentos de pirofosfato de (R,R)-  
pirodach-2

| N.º de formulación | Concentración de fosfato | Concentración de pirofosfato | pH  |
|--------------------|--------------------------|------------------------------|-----|
|                    |                          |                              |     |
| 1                  | 10 mM                    | 10,305 mM                    | 6,5 |
| 2                  | 10 mM                    | 10,305 mM                    | 7,5 |
| 3                  | ninguna                  | 10,305 mM                    | 7,5 |
| 4                  | ninguna                  | 10,305 mM                    | 6,5 |
| 5                  | 10 mM                    | 5,153 mM                     | 6,5 |
| 6                  | 10 mM                    | 5,153 mM                     | 7,5 |
| 7                  | ninguna                  | 5,153 mM                     | 7,5 |
| 8                  | ninguna                  | 5,153 mM                     | 6,5 |
| 9                  | 10 mM                    | ninguna                      | 6,5 |
| 10                 | 10 mM                    | ninguna                      | 7,5 |
| 11                 | 10 mM                    | 1,0305 mM                    | 6,5 |
| 12                 | 10 mM                    | 1,0305 mM                    | 7,5 |
| 13                 | 10 mM                    | 2,577 mM                     | 7,5 |
| 14                 | ninguna                  | 5,135 mM                     | 8,5 |

Ejemplo 10

Formulación acuosa lista para usar de (R,R)-pirodach-2  
(5 mg/ml de (R,R)-pirodach-2 en 10 mM de amortiguador de fosfato  
a un pH de 7) en viales de 10 ml

Se agregaron 24645,5 g de agua estéril para inyección en un vaso de precipitado de vidrio de 36 ml equipado con un mezclador mecánico. Se agregaron, con agitación, 47,03 g de fosfato de potasio dibásico de acuerdo con la USP y se dejó que los sólidos se disuelvan. Se agregaron 253,8 g de hidróxido de potasio 1,00 N en la solución agitada. Se usó agua estéril para inyección de acuerdo con la USP (900,0 g) como un enjuague para facilitar ambas adiciones. Se agregó lentamente, con agitación vigorosa, (R,R)-pirodach-2 (201,87 g) y la agitación continuó hasta que se disolvieron todos los sólidos. Se usó agua estéril para inyección de acuerdo con la USP (900,0 g) como un enjuague para facilitar la adición. Se determinó que el pH era de 6,7. Se agregó un total de 85 ml de hidróxido de potasio 1,00 N en alícuotas de 5,0 ml para ajustar el pH a 7,3. La solución se filtró de forma estéril a través de un filtro Millipore Millipack de 0,22  $\mu$  y se llenó de forma aséptica; 10 ml llenan un vial en 10 ml en viales moldeados transparentes de 10 cc de Wheaton, taponados con un tapón de 20 mm y engastados.

Los ejemplos y descripción precedentes de ciertas formas de realización preferidas deben tomarse como ilustrativos de la presente invención, más que como limitantes. Como apreciarán fácilmente las personas del oficio de nivel medio, se pueden utilizar numerosas variaciones y combinaciones de las características expuestas anteriormente sin apartarse de la presente invención.